

Etude de la réponse immunologique chez le vieillard et l'adulte, traités avec de fortes doses de tuberculine (PPD)

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

François JORIS

de

ORSIERES (Valais)

Thèse N° 3320

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545917_0064

Etude de la réponse immunologique chez le vieillard et l'adulte, traités avec de fortes doses de tuberculine (PPD)

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

François JORIS

de

ORSIERES (Valais)

Thèse N° 3320

La Faculté de médecine, sur le préavis du docteur Jean-Pierre Girard, chargé de cours, et du docteur Robert Junet, chargé de cours, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 15 décembre 1972

Le doyen:
William Geisendorf

Thèse No 3320



Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements aux docteurs J.P. Girard et R. Junet, chargés de cours, pour leurs judicieux conseils.

Ma reconnaissance va également à Mesdemoiselles Husler et Fremiot, ainsi qu'à tout le personnel du laboratoire du docteur J.P. Girard, qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

A MES PARENTS

Les lymphocytes jouent un rôle central dans les concepts actuels de la réponse immune. Les progrès réalisés dans la connaissance des fonctions de ces cellules sont en grande partie le résultat d'études pratiques in vitro et particulièrement de la transformation lymphoblastique. Cette méthode s'est révélée utile pour l'étude des états d'hyper-sensibilité en clinique humaine (1, 2, 3). Un autre application importante est la culture lymphocytaire mixte, utilisée pour la typisation des antigènes d'histocompatibilité (4).

Une étroite corrélation, chez l'animal immunisé, entre la transformation lymphoblastique et la réponse immune à support cellulaire, a été notée par plusieurs auteurs (5, 6, 7). Toutefois, quelques investigations cliniques (2, 3, 10) et expérimentales (8, 9, 11) semblent démontrer une participation de l'appareil immunologique humoral, au processus de transformation lymphoblastique.

On peut donc considérer la stimulation lymphocytaire, in vitro, par un antigène, comme une réponse secondaire, laquelle dans certains systèmes, met en jeu des lymphocytes B et T (12, 13), et ceci particulièrement lorsque l'antigène utilisé est formé d'un mélange complexe de déterminants antigéniques (10).

La tuberculine a été jusqu'ici très largement utilisée comme antigène pour la stimulation lymphocytaire in vitro (14, 15, 16). En général une corrélation a été notée entre le taux de transformation lymphoblastique et le degré de sensibilisation du patient (13, 15).

La stimulation non spécifique des défenses immunologiques a eu, chez l'homme, son heure de gloire au cours des premières décades de ce siècle, sous forme de tuberculinothérapie. Ce problème a retrouvé une actualité avec les traitements à la tuberculine ou au B.C.G., de patients atteints de tumeurs ou de leucémie (17).

Le traitement tuberculinique est appliqué fréquemment dans le service de médecine de l'Hôpital Beau-Séjour à Genève, à des patients âgés, atteints d'affections rhumatologiques. Une expérience de plusieurs années de ces traitements a permis de noter dans de nombreux cas une amélioration clinique évidente. Ces patients recevant en l'espace de quelques mois des concentrations considérables de tuberculine, il nous a paru intéressant d'analyser le comportement de leurs réponses immunologiques vis-à-vis d'une très haute dose d'antigène.

MATERIEL ET METHODES

Choix des patients : Deux séries de patients ont fait l'objet de cette étude. La première est composée de 15 sujets, âgés de plus de 65 ans, tous atteints d'arthrose généralisée, confirmée radiologiquement. Douze de ces patients avaient un test tuberculinique négatif à 10 i. u. de PPD Berna (Institut sérothérapique suisse, Berne). Il nous a paru important d'inclure dans l'étude, une série de patients plus jeunes. Il est en effet, bien connu que l'âge avancé est souvent accompagné d'une

dépression des réactions immunologiques (18, 27). Cette seconde série était donc composée de 10 sujets, dont l'âge variait de 18 à 40 ans, tous atteints d'affections orthopédiques et présentant un test nettement positif à la tuberculine (2 u.i. PPD).

Tous ces sujets ont reçu le traitement tuberculinique, lequel consistait en injections sous-cutanées dans le bras, de doses croissantes de tuberculine (PPD Berna, Institut sérothérapique, Berne). La première injection fut uniformément de 10 i. u. et la dose suivante fut calculée en fonction de la réaction à la dose précédente. L'intervalle entre les doses était de 8-10 jours.

La durée du traitement a varié de 2 à 5 mois, la même progression étant impossible dans tous les cas, et la dose maximale injectée a été de 50.000 i. u. de PPD (1,0 mg tuberculine). Avec les doses élevées, les réactions locales étaient en général fortes, caractérisées par une tuméfaction et un érythème d'une durée de plusieurs jours. Dans 2 cas, une poussée thermique à 39°C, accompagnée de céphalées, est apparue 18 heures après l'injection. Tous les patients étaient mis au courant du traitement entrepris et ont donné leur accord sans restriction.

Trois jours après la fin du traitement, les sujets jeunes ont reçu par voie intra-dermique une dose de 2.000 i. u. de streptokinase-streptodornase (Varidase Lederle).

Investigations immunologiques.

Culture lymphocytaire : Celle-ci a été pratiquée selon une technique publiée précédemment (19). En bref, 20 ml de sang veineux sont prélevés dans une seringue en présence d'héparine (50 i. u. /ml de sang). Les leucocytes sont séparés sur un mélange de Na métρίζoate-Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Suède) d'une densité de 1077.

Cette technique permet d'isoler de $5-8 \times 10^6$ lymphocytes/10 ml de sang. Après trois lavages dans une solution de Hanks (Difco, Détroit, USA), les cellules sont mises en culture dans du milieu TC 199 - (Difco, Détroit, USA), à raison de 2 ml pour 10^6 cellules. Le milieu est enrichi de 20 % de sérum humain AB.

Des cultures sont faites en présence de phytohémagglutinine-M (Difco, Détroit, USA) 0,05 ml/culture ou de tuberculine PPD, 10 i. u. /culture. Tous les échantillons sont cultivés en duplicats.

Après une incubation de 5 jours pour la tuberculine et de 3 jours pour la PHA, $1,0 \mu\text{C}$ de thymidine- H^3 (New England Nuclear Corp., Boston) est ajouté dans chaque flacon et la récolte est pratiquée 16 heures plus tard. L'acide desoxyribonucléique actif est extrait par lavages successifs, sur filtres Millipores, avec NaCl 0,15 M, acide trichloracétique 5 % et ethanol pur; les filtres sont placés dans des flacons à scintillation renfermant 10 ml de milieu de scintillation et l'activité est lue sur un compteur à scintillation liquide du type Beckman. Le résultat est exprimé en désintégration par minute (dpm).

Les cultures ont été pratiquées avec les lymphocytes des sujets mentionnés plus haut, avant, pendant et après le traitement. A titre comparatif, les lymphocytes de 45 sujets normaux, avec test tuberculinique positif (10 i. u.) et de 51 sujets normaux avec test tuberculinique négatif, ont été cultivés selon le même schéma. La stimulation lymphocytaire à la PHA a été faite dans 60 cas provenant de ces deux derniers groupes.

Tests cutanés.

La réponse cutanée consécutive à l'injection intradermique de tuberculine a été déterminée en prenant le diamètre moyen de la tuméfaction, 36 - 48 heures après l'injection.

Recherche d'anticorps hémagglutinants.

La technique d'hémagglutination passive adaptée par Favez et coll. (20) pour la détection d'anticorps anti-PPD, utilisant des érythrocytes de moutons tannés, a été utilisée. Une concentration de 0,01 mg de tuberculine (500 i. u.) a été utilisée pour la sensibilisation de 10^7 érythrocytes. Une incubation prolongée (4 heures) pour la sensibilisation des érythrocytes a donné des résultats optimaux. La dernière dilution du sérum donnant une agglutination a été considérée comme le titre d'anticorps.

Facteur inhibant la migration des macrophages.

Les éléments de base de la technique utilisée sont empruntés à David et coll. (21). Le facteur inhibiteur (MIF) a été préparé en incubant pendant 48 heures, des lymphocytes de patients traités ou de sujets normaux, en présence de tuberculine sans agent conservateur à raison de 100 i. u. / 10^7 cellules. (Staaten serum Institut, Copenhage). Le surnageant a été alors dialysé extensivement contre de l'eau distillée pendant 72 heures, puis concentré 10 fois, par lyophilisation.

Des macrophages péritoneaux de cobaye ont été recueillis 3 jours après l'injection intrapéritonéale de 20 ml d'huile de paraffine liquide, stérile. Après 3 lavages avec une solution de Hanks, les cellules ont été introduites par capillarité dans des capillaires d'un diamètre de 1,2 mm. Ceux-ci après centrifugation et section à l'interface cellules-liquide, ont été placés dans des chambres de cultures de tissus du type Sykes-Moore. Celles-ci. d'une contenance de 1,0 ml ont été remplies de TC 199 Difco + 10 % de sérum AB ou alors, d'un mélange 1 : 1 de TC 199 et de surnageant riche en MIF. L'aire de migration établie après 24 heures d'incubation à 37°C, a été agrandie par un microscope à projection et calculée par planimétrie. Le taux d'inhibition a été établi en faisant le rapport de la surface de migration avec MIF sur la surface de migration sans MIF et en multipliant par cent.

Mise en évidence de complexes antigène-anticorps dans le sérum de patients traités.

Des lymphocytes de donneurs PPD positifs et PPD négatifs ont été cultivés en présence de séra humains AB, d'un pool de séra provenant de 8 patients ayant une tuberculose pulmonaire évolutive, ces séra étant riches en anticorps anti-PPD (titre 1 : 128) et enfin en présence d'une pool de séra provenant de sujets jeunes traités à la tuberculine. La capacité de stimulation de ce pool de séra a également été testée après absorption répétée avec un sérum de lapin anti-gammaglobulines humaines (Hyland Lab., Los Angeles, USA).

L'activité des cultures est exprimée en dpm après 6 jours de culture.

Répartition leucocytaire.

Lors de chaque prise de sang de nos sujets traités, une répartition leucocytaire a été faite dans le but de contrôler l'évolution de la formule lymphomonocytaire.

RESULTATS

Stimulation par la tuberculine des lymphocytes de sujets PPD, positifs et négatifs. Groupe comparatif, comprenant des sujets sains non traités à la tuberculine.

Les résultats de ces investigations sont rassemblés dans le tableau I. En confirmation d'autres travaux (14-16), ils montrent une bonne corrélation entre la présence d'une réponse cutanée à la tuberculine, et l'augmentation de la synthèse de l'ADN par les lymphocytes cultivés en présence de cet antigène. Une grande variabilité dans l'intensité des réponses est présente, ce qui traduit probablement des degrés de sensibilité très différents selon les sujets. D'autre part, ces 96 patients représentent un éventail d'âge allant de 14 à 63 ans, facteur qui peut également participer à la variabilité des réponses. En revanche, les lymphocytes des sujets ayant une réaction cutanée tuberculinique négative, montrent une absence de réponse, in vitro, à cet antigène.

Tableau 1.

CULTURE DE LYMPHOCYTES HUMAINS. COLLECTIF DE SUJETS,
TEMOINS, NON TRAITES A LA TUBERCULINE. STIMULATION A
LA TUBERCULINE (PPD 10 i. u.) DE CELLULES PROVENANT DE
SUJETS PPD pos. et PPD nég. REPONSE A LA PHA.

Agent stimulant	Nbre de sujets	Activité en dpm $\pm$ SD
PHA	60	54080 $\pm$ 23700 (36200-113420)
<u>Sujets PPD +</u>	45	
avec PPD		1611 $\pm$ 340 (1290-3112)
sans PPD		746 $\pm$ 192 (250-984)
<u>Sujets PPD -</u>	51	
avec PPD		916 $\pm$ 224 (217-1215)
sans PPD		873 $\pm$ 178 (305-1054)

Stimulation par la tuberculine des lymphocytes de sujets traités.

Les résultats des stimulations lymphocytaires à la tuberculine des 2 séries de patents, sont illustrés dans la figure 1.

Sont indiqués les résultats des cultures témoins et des cultures faites en présence de PPD. Une première série de tests pratiqués avant le début du traitement, montre une stimulabilité normale à la tuberculine, chez les sujets jeunes, alors qu'elle ne diffère guère du contrôle chez les sujets âgés.

Dans les 2 groupes de patents, les cultures pratiquées au cours du traitement tuberculinique, sont remarquablement peu stimulables à la tuberculine, ce qui indique pour le collectif jeune, une disparition de la réponse initiale, et pour le collectif âgé, une absence de réponse. Il est important de noter que pour les 2 collectifs, la culture pratiquée 3 mois après la fin du traitement, ne montre guère de récupération de la stimulabilité. En revanche, dans le groupe 2, les cultures témoins (sans PPD) montrent, au cours du traitement une nette augmentation d'activité.

Stimulation par la PHA de lymphocytes de sujets traités.

Ces résultats sont représentés dans la figure 2. Dans le groupe des sujets jeunes, la réponse à la PHA avant le traitement est du même ordre de grandeur que dans le groupe témoin mentionné plus haut. Dans une première phase du traitement on note une nette augmentation de la stimulabilité à la PHA, avec un retour à des valeurs proches de la normale, au cours du traitement. Dans le collectif de sujets âgés on note une stimulabilité à la PHA, avant traitement, nettement inférieure à celle des autres groupes. Le début du traitement est caractérisé par une augmentation de la réponse à la PHA qui persiste plus longtemps que chez les sujets jeunes. Notons également une discrète hypostimulabilité à la PHA chez les sujets jeunes, 3 mois après la fin du traitement.

Anticorps hémagglutinants à la tuberculine.

La présence d'anticorps sériques anti-PPD a été recherchée dans les 2 groupes de patients, avant, au début, au milieu et à la fin du traitement.

Comme l'indique la figure 3, une nette augmentation d'anticorps circulants est présente, parallèlement à l'augmentation des doses du tuberculine administrées, avec toutefois un accroissement plus marqué dans le groupe des sujets jeunes. A noter, un retour à la normale, 3 mois après la fin du traitement.

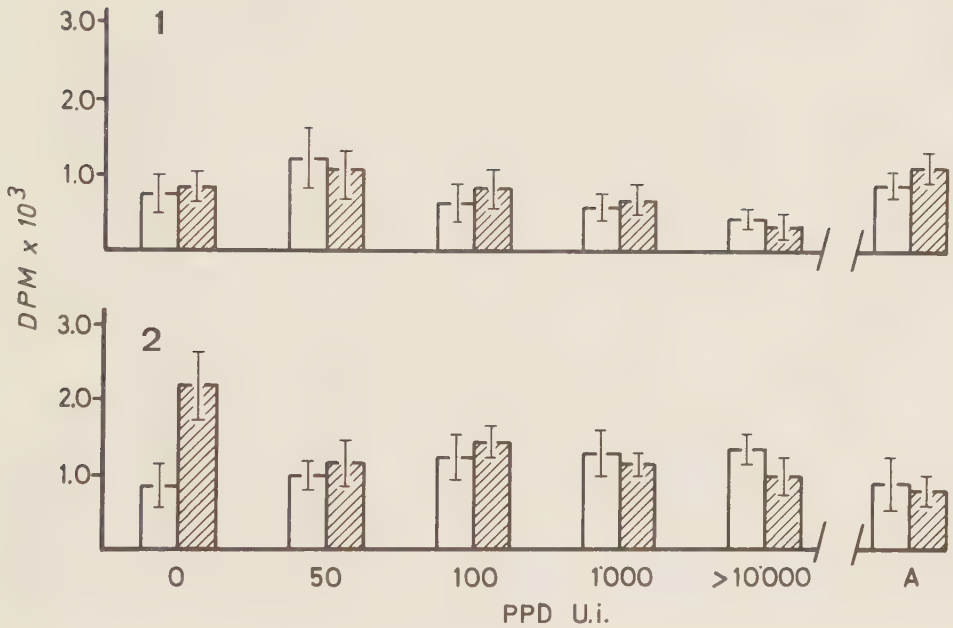


Figure 1 :

Stimulation lymphocytaire in vitro estimée par l'incorporation de thymidine-H3 dans l'ADN.

Activité exprimée en dpm. $\pm$ 1 SD.

1. : Collectif de patients âgés : 15 sujets.

2. : Collectif de patients jeunes : 10 sujets.

Colonnes blanches : culture sans antigène.

Colonnes hachurées : culture pratiquée en présence de 10. i.u. de PPD par culture.

Tests pratiqués avant et au cours de l'administration de doses croissantes de tuberculine, (10-50000 i.u.).

A : Contrôle pratiqué 3 mois après la fin du traitement.

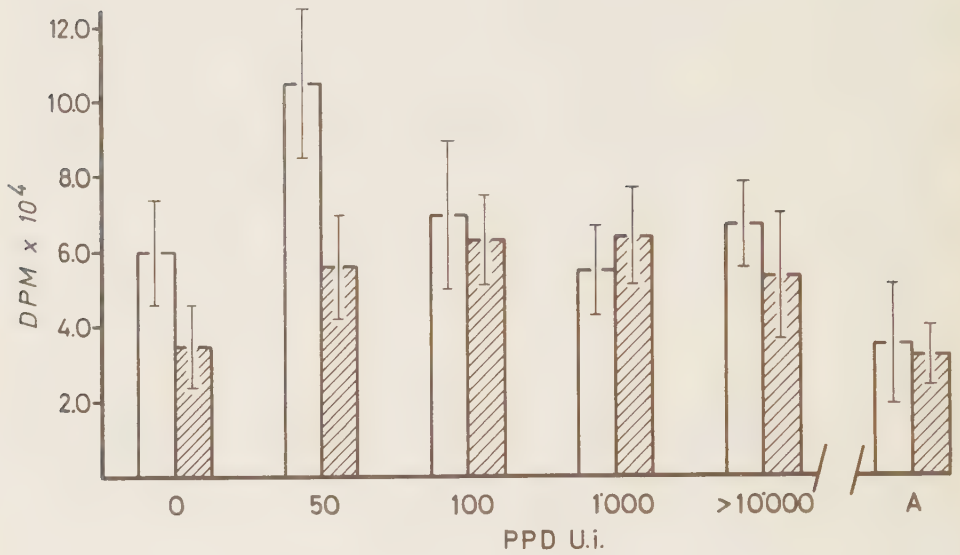


Figure 2 :

Stimulation lymphocytaire in vitro, par la **PHA**, avant et au cours du traitement, à doses croissantes de tuberculine.

Activité exprimée en dpm + 1 SD.

Colonnes blanches : collectif de patients jeunes : 10 sujets.

Colonnes hachurées : collectif de patients âgés : 15 sujets.

A : Contrôle pratiqué 3 mois après la fin du traitement.

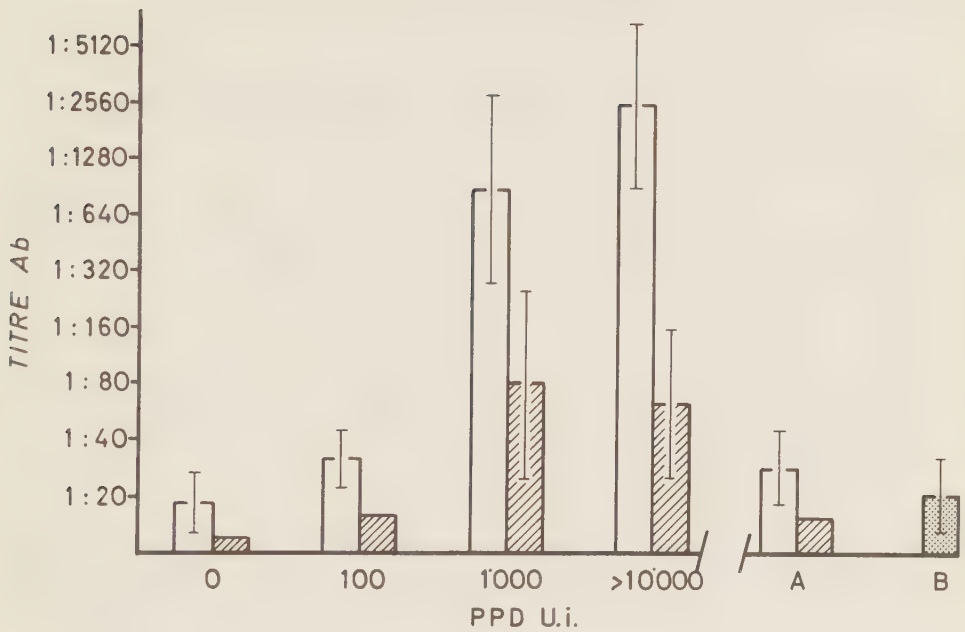


Figure 3 :

Détermination d'anticorps sériques anti PPD $\pm$ 1 SD. avant et au cours du traitement à la tuberculine.

Colonnes blanches : collectif de patients jeunes : 10 sujets.

Colonnes hachurées : collectif de patients âgés : 15 sujets.

A : Contrôle pratiqué 3 mois après la fin du traitement.

B : A titre comparatif, titre d'anticorps anti-PPD chez 10 sujets témoins avec tests tuberculiniques nettement positifs à 2 i. u. PPD.

Tests cutanés à la tuberculine au cours du traitement.

Avant le début du traitement, ainsi qu'après chaque nouvelle injection d'antigène, des tests cutanés ont été pratiqués au moyen d'une dose de 10 i. u. de PPD injectée par voie intradermique.

Ces résultats illustrés par la figure 4, indiquent une augmentation considérable du diamètre de la réaction, chez les sujets jeunes, et plus modeste chez les patients âgés, au cours de la progression du traitement.

Alors que la réaction cutanée est chez les patients âgés nettement plus importante 3 mois après la fin du traitement qu'avant celui-ci, elle semble revenue à des valeurs normales chez les sujets jeunes.

Tests à la streptokinase - streptodornase (SKD).

Afin de déterminer la réponse de sujets traités à un antigène de type cellulaire autre que la tuberculine, les sujets du collectif jeune ont reçu une dose intradermique de streptokinase-streptodornase (Varidase Lederle), correspondant à 2000 i. u. , 3 jours après la fin du traitement tuberculinique.

Tous les sujets ont développé une réaction cutanée importante. Trois jours plus tard, une stimulation lymphocytaire a été pratiquée en présence de ces enzymes streptococciques. La même investigation a été pratiquée chez 6 sujets témoins, présentant un test cutané positif, à une même concentration de streptokinase-streptodornase.

Les résultats illustrés par la figure 5, montrent une certaine corrélation entre les deux tests chez les sujets témoins, alors que les sujets traités présentent une nette hypostimulabilité lymphocytaire à la streptokinase-streptodornase.

Test d'inhibition de la migration des macrophages.

Un exemple de migration est illustré dans la figure 6. Le test indirect a pu être pratiqué dans de bonnes conditions avec les lymphocytes de 6 patients. Les résultats exprimés en pour cent d'inhibition sont donnés dans la figure 7.

A titre de comparaisons, les résultats de tests pratiqués au moyen MIF provenant des lymphocytes de 6 sujets normaux, présentant un test tuberculinique cutané nettement positif à 2 i. u. de PPD et de 6 adolescents ayant un test tuberculinique négatif, sont également représentés.

Cette figure montre une absence de production de MIF par les lymphocytes de sujets non sensibilisés à la tuberculine, alors que les cellules des 6 sujets traités et des 6 témoins PPD + produisent le facteur inhibiteur de la migration des macrophages.

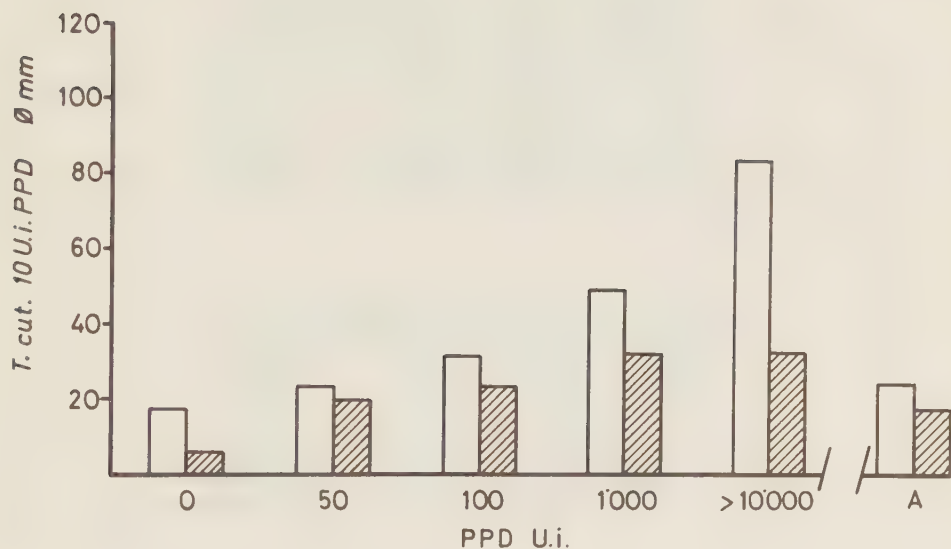


Figure 4 :

Tests cutanés pratiqués avec une quantité constante d'antigène (10 i. u. PPD), avant et au cours du traitement à la tuberculine.

Colonnes blanches : collectif de patients jeunes : 10 sujets.

Colonnes hachurées : collectif de patients âgés : 15 sujets.

A : Contrôle pratiqué 3 mois après la fin du traitement.

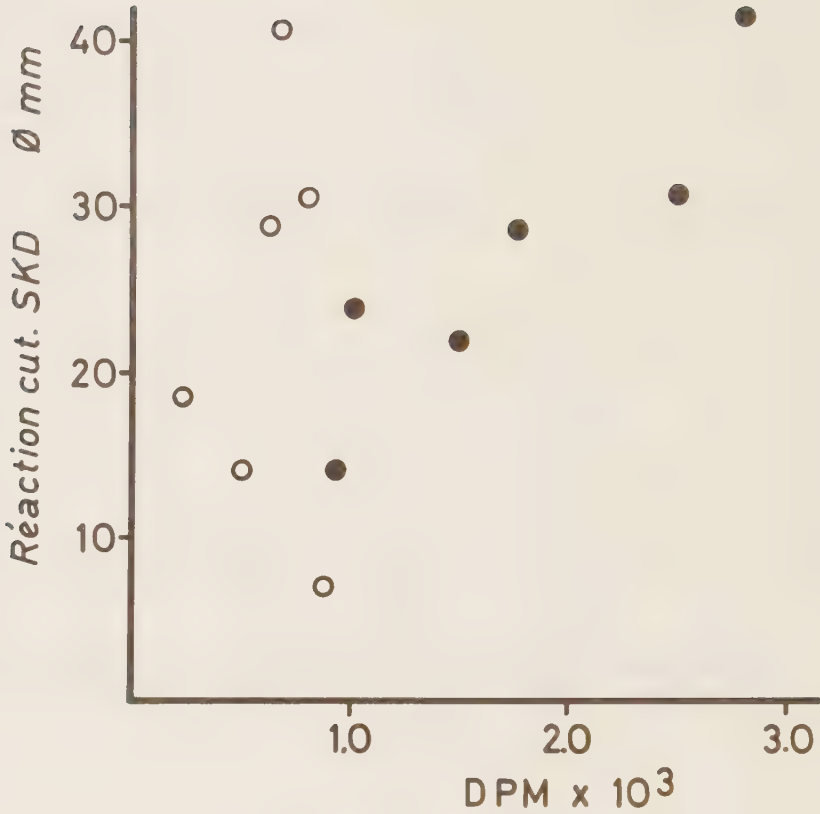


Figure 5 :

Corrélation entre les tests cutanés à la streptokinase-streptodornase, (SKD) (2.000 i.u.) et la stimulation lymphocytaire à ce même antigène.

= 10 sujets jeunes testés immédiatement après la fin du traitement tuberculinique.

= 6 sujets témoins.

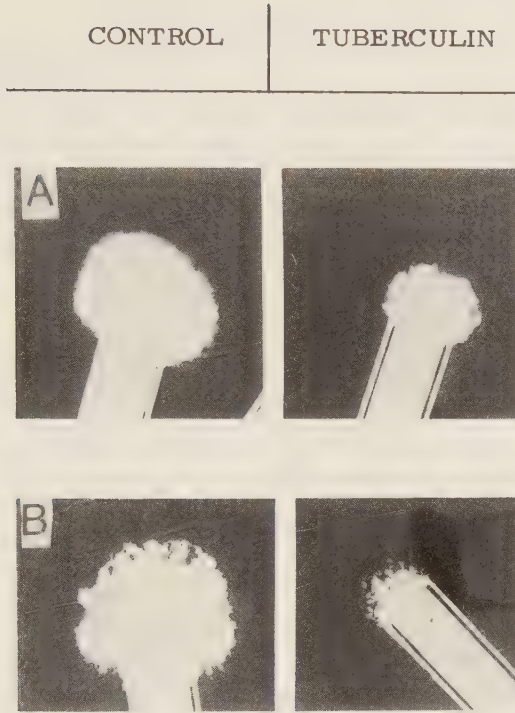


Figure 6 :

Test d'inhibition de la migration des macrophages péritonéaux de cobayes par le MIF.

A gauche, absence d'inhibition.

A droite, inhibition en présence du MIF.

A : Test préparé à partir de lymphocytes de patients traités à la tuberculine.

B : Test préparé à partir de lymphocytes de sujets témoins PPD +.

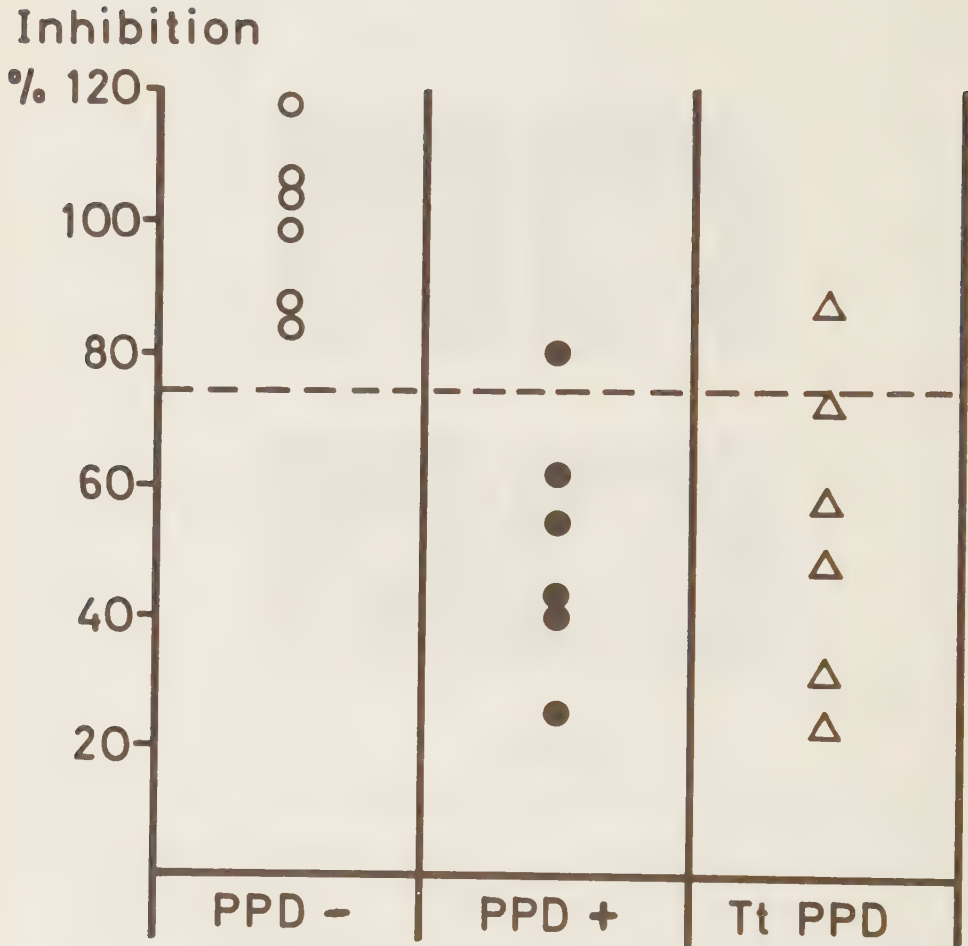


Figure 7 :

Test d'inhibition de la migration des macrophages péritonéaux de cobayes. En ordonnée, échelle de migration en pour-cent.

MIF préparé avec des lymphocytes de sujets PPD nég.

MIF préparé avec des lymphocytes de sujets PPD pos.

MIF préparé avec des lymphocytes de sujets traités par la tuberculine.

Recherche de complexes antigène-anticorps dans le sérum de patients traités.

Les valeurs moyennes des résultats sont indiquées dans le tableau II. Le sérum de patients tuberculeux ainsi que le sérum des patients traités à la tuberculine, renferment un facteur capable de stimuler, in vitro, non seulement des lymphocytes de donneurs PPD + mais aussi de donneurs réagissant négativement à cet antigène.

Lorsque les anticorps ou complexes antigène-anticorps présents dans le sérum de patients traités à la tuberculine sont absorbés au moyen d'un sérum anti-gammaglobulines humaines, il subsiste une activité résiduelle dont l'agent responsable n'a pas été identifié.

Répartition des cellules lymphocytaires au cours du traitement.

Ces investigations indiquent une augmentation des lymphocytes au cours du traitement, les valeurs moyennes passant de 24 à 35 %, alors que le pourcentage de monocytes ne change pas d'une manière significative.

Tableau II.

PRESENCE DE FACTEURS STIMULANT LA PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE DANS LE SERUM DE PATIENTS ATTEINTS DE TUBERCULOSE PULMONAIRE ET DE PATIENTS TRAITES A LA TUBERCULINE. ESSAIS PRATIQUES SUR DES LYMPHOCYTES DE SUJETS PPD - et PPD + .

Milieux ajoutés aux cultures	Nombre de cultures	Activité en dpm ⁺ S. D.	
		Lymphocytes PPD-	Lymphocytes PPD +
- Sérum humain AB	30	802 $\pm$ 196	915 $\pm$ 217
- Pool de sera de patients tuberculeux	15	1 428 $\pm$ 228	1 871 $\pm$ 419
- Pool de sera de patients traités à la tuberculine	8	2420 $\pm$ 630	2905 $\pm$ 594
- Pool de sera de patients traités après absorption	8	1 946 $\pm$ 332	1 627 $\pm$ 251
- Pool de sera de lapin	6	1 190 $\pm$ 276	1 013 $\pm$ 284

DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours de ce travail, confirment certaines notions déjà connues et posent quelques nouveaux problèmes.

Comme l'avaient déjà montré certains auteurs (6, 7) il existe, chez l'homme, une certaine corrélation entre la réponse cutanée à l'antigène tuberculine et la stimulabilité lymphocytaire, *in vitro*, à cet antigène; résultat confirmé dans cette étude. Cette corrélation semble nettement quantitative, et par exemple, la stimulabilité lymphocytaire de sujets qui ne développent une réponse cutanée qu'à une concentration élevée de PPD (50 i. u.) est en général très discrète (22, 23).

Un deuxième point démontré ici, quoique sommairement, est la dépression relative de la fonction de l'appareil immunologique, chez des patients âgés. En effet, l'extinction fréquente des réactions tuberculini-ques chez les sujets âgés est un phénomène bien connu, souligné déjà par Canetti (24) en 1946 et plus récemment analysé en détail (26). Une étude dans le temps de tels sujets a montré l'affaiblissement progressif des tests cutanés lorsque ceux-ci étaient pratiqués à intervalles réguliers (25).

Il faut noter qu'il s'agit là d'un phénomène involutif général et comme l'a montré Gross (18) le pourcentage de sensibilisation primaire au dinitrochlorobenzène qui est de 96,7 % chez l'adulte descend à 62 % chez les patients de plus de 65 ans. Lewi (27) a montré qu'il y avait une excellente corrélation chez de tels sujets entre la réponse cutanée et la stimulation lymphocytaire à la tuberculine.

Dans quelle mesure une capacité lymphocytaire réactionnelle subsiste-t-elle chez ces sujets ? Les résultats obtenus dans le groupe de sujets âgés, sont, malgré le petit nombre de cas, une réponse à cette question. En effet, alors que le test cutané à 10 i. u. de PPD était négatif chez 12 sujets sur 15 avant le traitement, celui-ci a suscité une réponse immunologique remarquable chez tous les patients, quoique moins intense que chez les sujets jeunes.

La discordance entre le développement de la sensibilité humorale et la réponse lymphocytaire *in vitro*, au cours du traitement à la tubercu-line, représente le résultat le plus troublant de ce travail. En effet, l'antigène PPD, extrait du bacille de Koch, est presque complètement débarrassé de ses polysaccharides, et il ne suscite dans la règle, lorsque injecté à des sujets sensibilisés, qu'une réponse tardive, atteignant son intensité maximum 48 heures après l'administration (41). Il est vrai que des anticorps circulants dirigés contre l'antigène PPD sont souvent présentés chez des sujets présentant une tuberculose active (20) et il faut admettre que lorsque le stimulus antigénique est suffisamment intense et prolongé, il suscite la formation d'anticorps circulants contre la fraction protéique du B. K.

La transformation lymphoblastique étudiée chez nos patients traités fait apparaître 2 phénomènes contradictoires. D'une part, l'administration de tuberculine à forte dose, semble avoir un effet stimulant sur la réponse à la PHA, d'autre part, l'addition de tuberculine à la culture lymphocytaire n'aboutit pas à une stimulation significative par rapport aux cultures témoins. Ceci pourrait être considéré comme une conséquence de l'hypergie tuberculinique chez nos sujets âgés. Contre cet argument il faut relever que la stimulation tuberculinique était nettement positive, avant le traitement, dans le groupe des jeunes.

On peut semble-t-il écarter l'hypothèse d'un mécanisme de " split-tolérance " portant sur les manifestations d'hypersensibilité cellulaire, la capacité de produire des anticorps étant intacte - situation analogue à celle étudiée chez le poulet par Stark et coll. (29).

En effet, et ceci est particulièrement net chez les sujets jeunes, on assiste au cours du traitement à un accroissement significatif de la synthèse spontanée d'ADN dans les cultures témoins. Ceci tend à prouver que les fortes doses d'antigène administrées mobilisent la presque totalité des lymphocytes sensibilisés, suscitant de la sorte une lymphoblastogénèse in vivo. Un phénomène analogue a déjà été démontré chez le lapin sensibilisé (30) lorsque la stimulation lymphocytaire est pratiquée peu de jours après un rappel antigénique. Il n'y aurait alors plus suffisamment de cellules sensibilisées dans la population lymphocytaire prélevée pour répondre à un stimulus antigénique, in vitro. L'augmentation très massive des réponses cutanées à la tuberculine au cours du traitement, est un argument de plus en faveur d'une relation dose-effet entre la quantité d'antigène administrée et l'intensité de la réponse immunologique de type cellulaire.

Toutefois l'accroissement considérable du taux d'anticorps circulants au cours du traitement, suggère une autre explication, soit une inhibition de la réponse cellulaire par les anticorps. En effet, bien que la plupart des publications traitant de l'immunosuppression par les anticorps impliquent une action sur la sensibilité humorale, quelques travaux apportent des arguments en faveur d'une suppression possible de la réponse immune de type cellulaire (31, 32, 33). Stuart et coll. (32) par exemple, montrent que dans le domaine de la transplantation, la présence d'anticorps " facilitants " retarde considérablement le rejet de l'allogreffe. On explique ce phénomène par la formation d'un barrage d'anticorps à la surface des cellules cibles. Toutefois d'autres auteurs défendent l'hypothèse d'un mécanisme de compétition entre les anticorps et les lymphocytes pour la prise en charge de l'antigène (31). Cette hypothèse est dans notre cas peu vraisemblable. En effet, comme l'a démontré Uhr (34) les complexes antigène-anticorps se fixent aisément à la surface des lymphocytes, ce qui aboutit, lorsque les conditions requises sont présentes, à une stimulation lymphocytaire (35). Il est vrai que les expériences mentionnées ici ont été pratiquées avec des lymphocytes de sujets non sensibilisés à l'antigène utilisé.

Dans un précédent travail de ce laboratoire (36) nous avons montré qu'un pool de sera, riche en anticorps anti-PPD, provenant de patients avec une tuberculose pulmonaire évolutive, était capable de stimuler, in vitro, des lymphocytes de donneurs avec tests cutanés tuberculiniques positifs et négatifs. Cette investigation reprise dans la présente étude, montre qu'un pool de sera de nos patients traités à la tuberculine, suscite de même une stimulation de lymphocytes sensibilisés ou non à cet antigène. A noter que l'absorption de ces sera avec un sérum anti-gammaglobulines humaines diminue leur pouvoir stimulateur sans l'abolir. Nous pensons que l'activité résiduelle peut être due à la présence dans le sérum de lymphokines circulantes, du type facteur mitogénique (37). Ce résultat tend à démontrer que des complexes antigène-anticorps sont présents dans le sérum de nos patients ainsi que des anticorps libres. Toutefois en admettant un effet inhibiteur de ces anticorps sur la réponse cellulaire on s'attendrait à une inhibition de tous les paramètres de ce type de réponse soit, en plus de la réponse lymphocytaire, à un effet sur les tests cutanés et la formation de MIF, ce qui n'est pas le cas.

L'administration de tuberculine a eu pour conséquence, chez tous nos sujets, une augmentation de la stimulabilité lymphocytaire à la PHA. Quel en est le mécanisme ? Lorsque deux antigènes auxquels un patient est sensibilisé sont mis en présence de lymphocytes, en culture à court terme, il n'y a pas de sommation des effets lorsqu'une concentration optimale est utilisée (1, 38) bien qu'un résultat différent ait été rapporté par Ling et Husband (39) utilisant la tuberculine et l'antigène variolique. Cette différence est peut-être imputable à la nature des antigènes employés. En effet, dans les deux rapports cités plus haut, des allergènes (extraits de pollen, moisissures) ont été utilisés pour la stimulation.

D'autre part, aucune sommation de la lymphoblastogénèse n'a été notée lorsqu'un antigène auquel le sujet était sensibilisé a été ajouté à la culture lymphocytaire en présence du PHA (1).

Les résultats observés ici sont peut-être explicables à la lumière des travaux de Waksman et Matolsty (40) qui ont montré que l'administration de tuberculine au cobaye sensibilisé entraine rapidement une prolifération des macrophages péritonéaux avec apparition de formes jeunes. Une prolifération locale de macrophages au lieu d'injection de BCG ou tuberculine a de même été observée chez le cobaye par Dannenberg (41). Par conséquent, l'une des hypothèses à envisager pour expliquer l'accroissement de la réponse lymphocytaire à la PHA, chez les patients traités à la tuberculine, est une stimulabilité accrue du système réticuloendothélial et particulièrement de l'appareil phagocytaire. On sait en effet que dans la phase proliférative de la réponse immune, plusieurs médiateurs sont libérés par les lymphocytes sensibilisés dont les fonctions, mal connues in vivo, consistent entre autres en une activation et mobilisation des macrophages et une activité mitogénique sur les lymphocytes sensibilisés ou non (37, 42). Notons ici que les lymphokines libérées par les lymphocytes stimulés à la PHA sont, par

leurs propriétés, tout à fait comparables à celles obtenues par stimulation antigénique (43). Il est donc possible que ces divers médiateurs soient capables de mobiliser, à partir des réserves du tissu lymphoïde, une quantité accrue de lymphocytes sensibles à l'effet de la PHA. Enfin, c'est peut-être à cette stimulation de l'appareil phagocytaire que l'on doit l'effet thérapeutique, non spécifique, parfois observé, de substances telles que la tuberculine ou le BCG.

La production du MIF in vitro, telle qu'elle a été démontrée avec les lymphocytes de quelques patients traités, est un argument de plus à élever contre l'hypothèse d'une tolérance immunitaire, exprimée par une absence de réponse à la stimulation tuberculinique in vitro.

Bien que des observations privilégiées de production de MIF sans stimulation lymphocytaire correspondante, aient été publiées (44), elles concernent des sujets présentant des déficits immunitaires importants et n'obéissent pas à la règle généralement observée. Chez le sujet normal, la production de MIF par les lymphocytes sensibilisés est un phénomène précoce qui survient déjà après 2 heures d'exposition à l'antigène, alors que la transformation lymphoblastique ne débute qu'après 24 heures (45). Malgré cette différence de cinétique, la production de MIF semble liée à l'activation de cellules sensibilisées par l'antigène spécifique, et à ce titre, peut être considérée comme l'expression d'une réponse immunologique à support cellulaire (46).

Le dernier fait curieux à discuter est la très faible réponse lymphocytaire in vitro, à la SKD chez des sujets présentant par ailleurs un test cutané fortement positif à cet antigène. Les cultures lymphocytaires n'ayant été pratiquées que 3 jours après les tests cutanés, l'explication fournie pour la stimulation tuberculinique peut être valable ici aussi. Il est de même possible qu'en raison de la proximité du traitement tuberculinique, c'est-à-dire de la forte stimulation lymphocytaire in vivo, les concentrations de SKD étaient au-dessous de l'optimum préconisé par Caron (38) dans le cas de stimulation simultanée à deux antigènes.

Enfin, relevons que nos résultats ne peuvent guère être interprétés à la lumière des observations de Chaparas et coll. (47). Ces auteurs ont immunisé des cobayes au BCG et pratiqué des investigations immunologiques avec d'une part la fraction hydrocarbonée, d'autre part la fraction protéique de l'antigène. Ils observent que la transformation lymphoblastique est le fait de la fraction protéique alors que la fraction hydrocarbonée de l'antigène serait responsable de la réactivité cutanée et de la production de MIF. Mise à part la différence d'espèce on ne peut guère avancer d'explication susceptible de réconcilier ces observations avec les nôtres ou faut-il admettre que la faible quantité de polysaccharides contenue dans l'antigène PPD a été suffisante pour susciter chez nos patients la formation de MIF et dans une certaine mesure la forte réactivité cutanée ?

Il faut noter enfin, que pendant toute la durée du traitement à la tuberculine, la leucocytose des patients a toujours été au-dessus des valeurs moyennes admises, oscillant entre 8.000 et 12.000 leucocytes/mm³. Le pourcentage des monocytes n'a pas varié d'une manière significative; en revanche, la lymphocytose moyenne a passé de 24 % avant traitement à 35 % après traitement. Ce phénomène est habituellement observé lors d'une administration prolongée d'antigène chez l'homme et l'animal d'expérience.

RESUME

Différents paramètres de la réponse immunologique ont été étudiés chez des patients, avant, au cours, et après l'administration de doses croissantes de tuberculine, (PPD) administrée jusqu'à une concentration maximum de 50.000 i. u. Un groupe de patients âgés (65 ans) et un groupe de sujets jeunes (20-40 ans) ont été étudiés.

Dans les deux groupes une augmentation considérable du titre d'anticorps sériques, anti-PPD ainsi qu'un accroissement du diamètre de la réponse tuberculinique cutanée, à une dose constante d'antigène, a été observée. Ceci est particulièrement frappant dans le collectif des sujets âgés qui présentaient au départ, soit une absence ou une très faible réponse cutanée à la tuberculine.

Dans les deux groupes également, le traitement tuberculinique a entraîné une augmentation de la stimulabilité des lymphocytes à la PHA. La production de MIF a été recherchée avec les lymphocytes de 6 sujets traités. Dans tous les cas, cette production a été du même ordre de grandeur que celle obtenue à partir des lymphocytes provenant de sujets témoins PPD +.

Des cultures lymphocytaires ont été pratiquées au cours du traitement tuberculinique. Une absence de stimulation lymphocytaire a été notée dans tous les cas. En revanche, une augmentation de la synthèse spontanée d'ADN, en l'absence de tuberculine, a été régulièrement observée, particulièrement chez les sujets jeunes.

Cette observation peut être expliquée par l'hypothèse d'une stimulation maximum in vivo, des lymphocytes sensibilisés à la tuberculine.

On peut considérer que l'effet éventuellement bénéfique des traitements à la tuberculine est lié à une stimulation antigénique intense des cellules du système réticulo-endothélial et particulièrement une activation des cellules phagocytaires.

BIBLIOGRAPHIE

1. Girard J. P. , Rose N. R. , Kunz M. L. , Kobayashi S. et Arbesman C. E. : In vitro lymphocyte transformation in atopic patients induced by antigens.
J. Allergy, 39, 65, 1967.
2. Halpern B. , Ky N. T. , Amache N. , Largue G. et Hazard J. : Diagnostic de l'allergie médicamenteuse in vitro par l'utilisation du test de transformation lymphoblastique.
(TTL). Presse med. 75, 461, 1967.
3. Fellner M. J. , Baers R. L. , Ripps C. S. et Hirschhorn K. : Response of lymphocytes to penicillin. Comparison with skin tests and circulating antibodies in man.
Nature (London) 216, 803, 1967.
4. Wilson D. B. et Billingham R. E. : Lymphocytes and transplantation immunity.
Adv. Immunol. 7, 189, 1967.
5. Mills J. : The immunological significance of antigen induced lymphocyte transformation in vitro.
J. Immunol. 97, 239, 1966.
6. Zweiman B. : Temporal relationship between tuberculin skin reactivity and the in vitro mitotic response.
Immunology 13, 315, 1967.
7. Oppenheimer J. J. : Relationship of in vitro lymphocyte transformation to delayed hypersensitivity in guinea-pigs and men.
Fed. Proc. 27, 21, 1968.
8. Loewi G. , Templ A. et Vischer T. L. : The immunological significance in guinea-pig, of the in vitro transformation of lymph node spleen and peripheral blood lymphocyte.
Immunology 14, 275, 1968.
9. Benezra D. , Gery L. et Davies A. M. : Antibody formation and blastogenesis.
Lancet ii, 1046, 1967.

10. Girard J. P. : Antibody synthesis in vitro by human peripheral blood lymphocytes.
Int. Arch. Allergy, 32, 294, 1967.
11. Benezra D., Gery L. et Davies A. M. : The relationship between lymphocyte transformation and immune response.
Clin. exp. Immunol. 5, 155, 1969.
12. Valentine F. T. : The transformation and proliferation of lymphocytes in vitro. In " Cell-mediated immunity. In vitro correlates " pp. 6, Karger, Basel, New-York, 1971.
13. Ling. N. R. : Lymphocyte stimulation. North-Holland Publ. Comp. Amsterdam 1968.
14. Cowling D. C., Quagliano D. et Davidson E. : Changes induced by tuberculin in leucocyte cultures.
Lancet ii, 1091, 1963.
15. Marshall W. H. et Roberts K. B. : Tuberculin induced mitosis in peripheral blood leucocytes.
Lancet i, 773, 1963.
16. Permain G., Lycette R. R. et Fitzgerald P. H. : Tuberculin induced mitosis in peripheral blood leucocytes.
Lancet, i, 637, 1963.
17. Mathé G. : Experimental basis and first clinical controlled trials of leukemia active immunotherapy. In " Progress in Immunology " pp. 959. Proc of the 1st Int. Congress of Immunology, Washington 1971, B. Amos ed. Academic Press New-York, London, 1971.
18. Gross L. : Immunological defect in aged population and its relationship to cancer.
Cancer 18, 201, 1965.
19. Girard J. P. : Studies on human peripheral lymphocytes. Antibody and DNA synthesis and incorporation of ^{14}C -labelled amino-acids, following antigenic stimulus.
Helv. med. Acta 34, 191, 1968.
20. Favez G., Jequier S. et Vulliemoz P. : Détection d'anticorps spécifiques chez les tuberculeux évolutifs.
Schweiz. med. Wschr. 94, 1251, 1964.

21. David J. R. , Al-Askari D. , Lawrence H. S. et Thomas L. :
Delayed hypersensitivity in vitro. I. The specificity of
inhibition of cell migration by antigen.
22. Chaparas S. D. , Sheagren J. N. , Denaco A. et Hendrick S. :
Correlation of human skin reactivity with lymphocyte
transformation induced by mycobacterial antigens and
histoplasmin.
Amer. Rev. resp. Dis. 101, 67, 1970.
23. Kerby G. R. : Correlation of tuberculin skin reaction with
in vitro lymphocyte transformation.
Amer. Rev. resp. Dis. 97, 904, 1968.
24. Canetti G. : L'allergie tuberculinique chez l'homme.
Flammarion, Paris, 1946.
25. Dequeker J. , Baeyens J. P. , Claessens J. et Gyselin A. :
Evolution of tuberculin sensitivity with advancing age.
A three years follow-up study.
Gerontol. clinica, 10, 369, 1964.
26. Goujard J. : Exploration de la sensibilité tuberculinique
chez le sujet âgé.
Thèse, Paris 1969.
27. Lewi S. : Allergie cutanée tuberculinique et transformation
blastique des lymphocytes cultivés in vitro en présence de
tuberculine. Correlation chez 208 sujets âgés.
Ann. Inst. Pasteur 119, 630, 1970.
28. Heilman D. H. et McFarland W. : Mitogenic activity of
bacterial fractions in lymphocyte cultures. I. Purified
protein derivatives and polysaccharides of tuberculin.
J. Immunol. 96, 988, 1966.
29. Stark O. K. , Kren V. , Frenzl B. et Brdicka R. : Split
tolerance in chicks. in " Mechanism of immunological
tolerance ". pp. 123, Academic Press, New-York, 1962.
30. Girard J. P. : Studies on rabbit peripheral blood lymphocytes.
I. DNA and antibody synthesis, following antigenic stimulus.
Acta haemat. 39, 223, 1968.

31. Axelrad M. A. : Suppression of delayed hypersensitivity by antigen and antibody.
Immunology 15, 159, 1968.
32. Stuart F. P., Saitoh T. et Fitch F. W. : Rejection of renal allografts : specific immunological suppression.
Science, 160, 1465, 1968.
33. Axelrad M. A. et Rowley D. A. : Hypersensitivity. Specific immunological suppression of the delayed type.
Science, 160, 1465, 1968.
34. Uhr J. W. : Passive sensitization of lymphocytes and macrophages by antigen-antibody complexes.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 54, 1599, 1965.
35. Bloch-Shtacher N., Hirschhorn K. et Uhr J. W. : The response of lymphocytes from non-immunized humans to antigen-antibody complexes.
Clin. exp. Immunol. 3, 889, 1968.
36. Girard J. P., Poupon M. F., Press P. et Favez G. : Effet du sérum de patients tuberculeux sur la transformation lymphoblastique de sarcoidose.
Schweiz. med. Wschr. 100, 1986, 1970.
37. Wolstencroft R. A. et Dumonde D. C. : In vitro studies of cell-mediated immunity.
Immunology, Lond. 18, 599, 1970.
38. Caron G. A. : The effect of antigen in combination on lymphocyte transformation in vitro.
Int. Arch. Allergy 31, 521, 1967.
39. Ling N. R. et Husband G. M. : Specific and non specific stimulation of peripheral lymphocytes.
Lancet i, 363, 1964.
40. Waksman B. H. et Matoltsy M. : The effect of tuberculin on peritoneal exudate cells of sensitized guinea-pigs in surviving cell culture.
J. Immunol. 81, 220, 1958.

41. Dannenberg A. M. : Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis. Specificity systemic and local nature and associated macrophage enzymes. *Bacteriol. Rev.* 32, 85, 1968.
42. Girard J. P. , Poupon M. F. et Press P. : Culture of peripheral blood lymphocytes from sarcoidosis. Response to mitogenic factor.
Int. Arch. Allergy 41, 604, 1971.
43. Wolstencroft R. A. : Lymphocyte mitogenic factor in relation to cell mediated immunity. In " Cell-mediated immunity. In vitro correlates " pp. 130, Karger, Basel, New-York 1971.
44. Lawrence H. S. et Fishman M. : Transfer of immunity with cell-free extracts.
In " Progress in Immunology " pp. 1396, Proc. of the 1st Int. Congr. of Immunology. Washington 1971, B. Amos ed. Academic Press, New-York, London, 1971.
45. Bloom B. R. et Bennett B. : Migration inhibitory factor associated with delayed type hypersensitivity.
Fed. Proc. 27, 13, 1968.
46. Dumonde D. C. , Wolstencroft R. A. , Panayi G. S. , Matthews M. , Morley J. et Howson W. T. : Lymphokines : non antibody mediators of cellular immunity by lymphocyte activation.
Nature, Lond. 224, 38, 1969.
47. Chaparas S. D. , Thor D. E. et Hedrick S. R. : Comparison of lymphocyte transformation, inhibition of macrophage migration and skin tests using dialysable and non dialysable tuberculin fraction from mycobacterium bovis (BCG).
J. Immunol. 107, 149, 1971.

